

EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LOS EFECTOS DEL VENENO DE CROTALUS DURISUSS CUMANENSIS Y CROTALUS DURISSUS VEGRANDIS SOBRE TEJIDO HEPATICO, PULMONAR Y MUSCULO ESQUELETICO EN RATONES NMRI

* Karin Rodríguez – Carrasquilla; * Mirleny del Carmen Pérez – Urrieta; * José R. Noriega – Alvarado; ** Mariana Sanabria; *** Alexander Mogollón – Saldívar; *** Carmen Álvarez.

PALABRAS CLAVE: Veneno Crotalus. Lesiones Histopatológicas.

RESUMEN

El accidente ofídico es un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Entre las serpientes venenosas de Venezuela se encuentran las del género *Crotalus*, localizadas preferiblemente en las sabanas, piedemontes y regiones xerófilas. La toxicidad de los venenos viperinos, se debe a la acción de sus componentes sobre diferentes sistemas y tejidos. El objetivo de este trabajo fue determinar las alteraciones histopatológicas en hígado, pulmón, músculo esquelético en ratones hembras adultas NMRI inoculados con veneno de serpiente de *Crotalus durissus cumanensis* (CDC) y *Crotalus vegrandis* (CV). El veneno de estas especies fue obtenido del serpentario del Laboratorio de Toxicología del Decanato Ciencias Veterinaria de la UCLA. Se utilizaron ratones con un peso entre 25 a 30g provenientes del Bioterio Central de la UCLA. Se establecieron 2 grupos experimentales que fueron inoculados con una solución de veneno (CDC) ó de (CV) de acuerdo a su peso, completando a 50 µL con solución fisiológica y un grupo control que fueron inoculados con 50 µL de solución fisiológica al 0,9%. A las 12 y 24 horas post-inoculación se les extrajo el hígado, pulmón, músculo esquelético para su estudio histopatológico. En el tejido hepático de los ratones tratados con solución fisiológica se encontró que el parénquima hepático no presentó signos de alteraciones. A las 12 y 24 horas post-inyección el veneno de (CDC) y de (CV) induce alteraciones como hiperemia, enfisema, Hemorragia difusa severa y edema. El tejido musculo esquelético en los ratones inoculados con solución fisiológica reveló fibras musculares estriadas esqueléticas de aspecto normal y núcleos conservados. En los grupos experimentales de 12 Y 24 horas post-inoculados con veneno de (CDC) y de (CV) se evidenciaron las siguientes alteraciones histopatológicas: pequeños grupos de células musculares con edema, degeneración y necrosis de Zenker e infiltrado de células inflamatorias y leve necrosis de tejido adiposo cercano a músculo.

HISTOPATOLOGICAL EVALUATION OF THE EFFECTS OF VENOM AND CROTALUS DURISUSS CUMANENSIS CROTALUS DURISSUS VEGRANDIS FABRIC ON LIVER, LUNG AND SKELETAL MUSCLE IN NMRI MICE

ABSTRACT

The ofidism accident is an important problem of public health in the tropical and subtropical zones of the world. In Venezuela, there are the *Crotalus* sort poisonous serpents, located preferably in savannahs, piedemontes and xerofic regions. The toxicity of viperines poisons is due to the action of its components on different systems and weaves. The objective of this work was to determine the histopatologic alterations in liver, lung, skeletal muscle in mice adult females NMRI inoculated with poison of serpent of *Crotalus durissus cumanensis* (CDC) and *Crotalus vegrandis* (CB). The poison of these species was obtained from the serpentary of the Laboratory of Toxicology of the Sciences Veterinary Deanship of UCLA. 15 mice with a weight ranged 30 to 40g were used originating ones of the Central Biotery of UCLA. 2 experimental groups were inoculated with a poison solution (CDC) or of (CB) according to their weight, completing to 50 settled down µL with physiological solution and a group control that was inoculated with 50 µL of physiological solution to 0.9%. During 12 and 24 hours post-inoculation were extracted the liver, lung, skeletal muscle from them for their histopathology study. The liver parenquime found in the hepatic weave of the mice treated by physiological solution did not show signs of alterations. To the 12 and 24 hours post-injection the poison of (CDC) and of (CB) induces alterations like hiperemie, enfisema, severe diffuse Hemorrhage and edema. The weave skeletal muscle in the mice inoculated with physiological solution revealed skeletal muscular fibers fluted of normal aspect and nuclei conserved. In the experimental groups of 12 and 24 hours post-inoculated with poison of (CDC) and of (CB) the following histopatologic alterations were demonstrated: small groups of muscular cells with edema, degeneration and necrosis of infiltrated Zenker and of inflammatory cells and weigh fatty weave necrosis near muscle.

* Área de Bioquímica. Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” Barquisimeto, Venezuela.

** Área de Anatomía Patológica. Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” Barquisimeto, Venezuela.

*** Área de Toxicología. Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” Barquisimeto, Venezuela. Karinvet324@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El accidente ofídico es un importante problema de salud pública en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que cada año más de 2,5 millones de personas son mordidas, resultando alrededor de 120.000 muertes en las regiones tropicales de Asia, África y América Latina [1].

Entre las serpientes venenosas se encuentran las del género *Crotalus*, en Venezuela se han descrito hasta el presente cinco subespecies: *Crotalus durissus cumanensis*, *C. vegrandis*, *C. durissus ruruima*, *C. durissus pifanorum* y *C. durissus maricelae* [2,3], localizadas preferiblemente en las sabanas, piedemontes y regiones xerófilas [4] y están involucradas en el 20% de los accidentes ofídicos del país. Afectan con mayor frecuencia a la población de trabajadores rurales, especialmente campesinos jóvenes en plena actividad productiva; haciendo de este accidente una enfermedad profesional, cuyo impacto está relacionado con las secuelas y las defunciones que pueden llegar a ocasionar [5].

Los venenos de estos animales son una mezcla de componentes con diversos efectos en la víctima, como consecuencia el cuadro clínico que presentan las mordeduras es de gran complejidad [6], contienen enzimas proteolíticas, peptidasas, proteinasas, fosfolipasas, neurotoxinas que dan lugar a toxicidad y daño tisular, sus efectos involucran al sistema músculo esquelético, a la coagulación sanguínea, al área cardiopulmonar, al riñón y al sistema nervioso central [7]. Los signos de envenenamiento pueden variar dependiendo de la cantidad de veneno inoculado, la masa corporal de la víctima, el tiempo de evolución, la región afectada y la subespecie involucrada en el accidente. Los síntomas más frecuentes son: el dolor, edema progresivo, equimosis, parestesias, gingivorragia, flictenas, náuseas y coagulación intravascular diseminada [8].

La toxicidad de los venenos viperinos, se debe a la sumatoria de la acción de sus componentes sobre diferentes sistemas y tejidos. Esta complejidad de mecanismos pone en evidencia la importancia de conocer las características tóxicas y enzimáticas de los venenos. Para entender mejor la fisiopatología de los envenenamientos, se han realizado estudios sobre la caracterización de las actividades tóxicas de los venenos de serpientes de diferentes regiones del

mundo [9]. El estudio histopatológico es un determinante fundamental en los diagnósticos, en particular en los envenenamientos por animales ponzoñosos, el objetivo de este trabajo fue determinar las alteraciones histopatológicas en hígado, pulmón, músculo esquelético en ratones hembras adultas NMRI inoculados con veneno de serpiente de *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus vegrandis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El veneno de las especies *Crotalus durissus cumanensis* (CDC) y de *C. vegrandis* (CV) fue obtenido de animales en cautiverio que se mantienen en el serpentario del Laboratorio de Toxicología del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, su hábitat consisten en terrarios de vidrio de 40 cm de largo por 40 cm de ancho y 30 cm de alto con tapa de madera y malla metálica a una temperatura promedio de 30 °C durante el día y 24 °C en la noche, se alimentan una vez al mes con 2 ratones por ejemplar y agua *ab libitum*.

La extracción del veneno se realizó a 10 ejemplares adultos mediante ordeño manual como lo describe la técnica de Sandner [10], formando un pool que fue centrifugado a 800g a 4 °C por 10 min. a partir del veneno recolectado se preparó una solución para cada especie y se inoculó dosis de 0,75 mg de proteína/kg de ratón. [11].

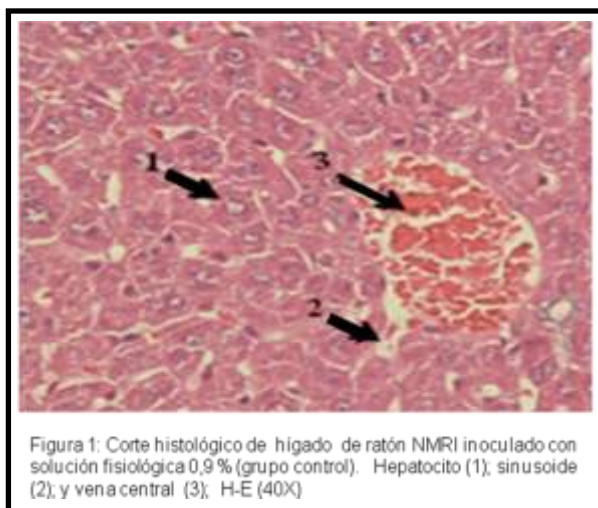
Se utilizaron 15 ratones hembras adultas NMRI con un peso entre 30 a 40g provenientes del Bioterio Central de la UCLA. Se establecieron 3 grupos: 2 grupos experimentales que fueron inoculados en el miembro posterior derecho, con una solución de veneno (CDC) ó de (CV) de acuerdo a su peso, completando a 50 µL con solución fisiológica. Los grupos controles fueron inoculados con 50 µL de solución fisiológica al 0,9%. A las 12 y 24 horas post-inoculación se les realizó eutanasia con éter y decapitación y se les extrajo el hígado, pulmón, músculo esquelético, que fueron inmediatamente fijados en formol bufferado al 10% e identificados para su estudio histopatológicos.

Para el estudio histopatológico los órganos fueron evaluados macroscópicamente tanto su aspecto como su coloración, se tomó 5 mm de tejido a evaluar y se colocó en un caset de inclusión,

posteriormente el tejido fue lavado y se deshidratado en un procesador de tejido con alcoholes (Marca Citadel 1000®). Seguidamente se procedió la desalcoholización y luego se impregnó el tejido con un dispensador de parafina (Marca National Calorik®); se cortaron los fragmentos para elaborar bloques de parafina con un micrótopo (Marca Jung®) a un espesor de 3 micras; se colocaron en baño de flotación para extender el tejido, se pescó para llevar al lamina portaobjeto y luego se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los cortes se examinaron con un microscopio de luz marca Olympus con aumento de 10X y 40X a fin de evidenciar la presencia de lesiones causadas por el veneno en los diferentes tejidos.

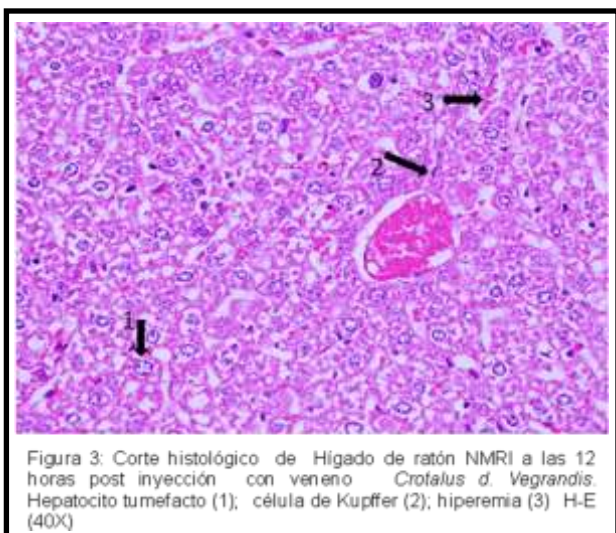
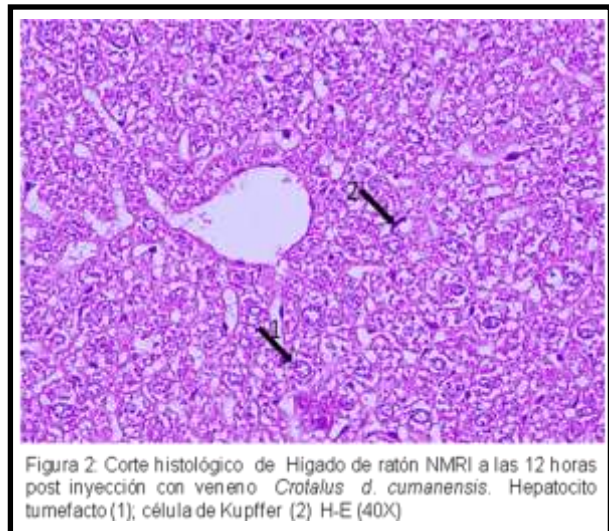
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tejido Hepático: En los cortes de tejido hepático de los ratones tratados con solución fisiológica se encontró que el parénquima hepático no presentó signos de alteraciones; los hepatocitos mostraron morfología conservada, cordones hepáticos de aspecto normal, los espacios porta, vena central lobular y sinusoides hepáticos intactos. (Figura 1).



La inyección intramuscular de 0,75 mg de proteína de veneno de (CDC) indujo alteraciones histológicas del tejido hepático a los ratones inoculados, el estudio histopatológico realizado a las 12 post-inyección revelo hepatocito tumefacto y presencia de las células de Kupffer (Figura 2). Mientras que, los ratones inoculados con veneno de (CV) se observó también hepatocitos tumefactos, células de kupffer e hiperemia (Figura 3). Los cortes histológicos no muestran diferencias significativas en

los efectos causados por veneno sobre el tejido hepático en ambas especies a las 12 horas post-inyección.



A las 24 horas los cortes histológicos de hígado de los ratones inoculados con veneno de (CDC) revelaron: hepatocitos tumefactos, pequeños focos de células inflamatorias y linfocitos (Figura 4). Mientras que, en los ratones inoculados con veneno de (CV) se observó hepatocitos tumefactos, células de kupffer reactivas y presencia de megalocitos (Figura 5).

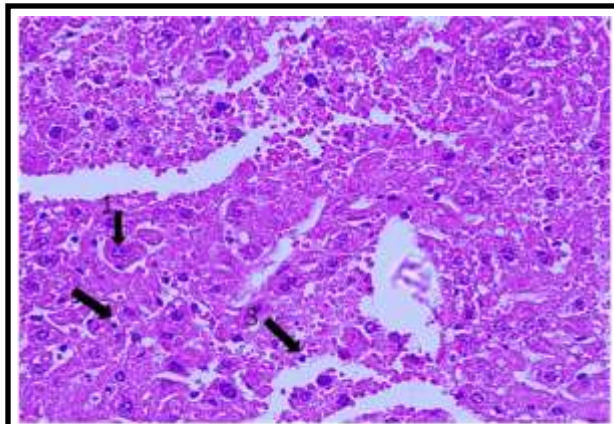


Figura 4: Corte histológico de Hígado de ratón NMRI a las 24 horas post inyección con veneno *Crotalus d. cumanensis*. Hepatocito tumefacto (1); células inflamatorias (2); linfocito (3). H-E (40X)

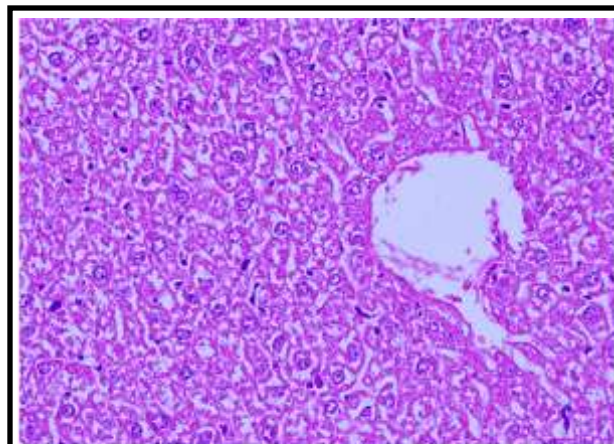


Figura 5: Corte histológico de Hígado de ratón NMRI a las 24 horas post inyección con veneno *Crotalus d. vegrandis*. Hepatocito tumefacto (1); megalocitos (2); células de Kupffer reactivas (3). H-E (40X)

Aunque son pocas las investigaciones sobre los daños histopatológicos causados por estas dos especies, estudios similares reportan que el veneno de *Crotalus durissus cumanensis* induce en el tejido hepático tumefacción celular severa, presencia de células de Kupffer y necrosis coagulativa focal [6]. Mientras que, *Crotalus durissus terrificus*, promueve infiltrado inflamatorio [12] congestión sinusoidal grave, hemosiderosis e hiperplasia en las células de Kupffer, necrosis centrolobulillar multifocal y grados variables de congestión sinusoidal [13]. Sin embargo, estudios realizados con el veneno de serpiente del género *Bothrops alternatus* en el tejido hepático observaron degeneración hidrópica difusa, comprometiendo distintas áreas del lobulillo, incluyendo zonas periportales y centrolobulillares [14].

Tejido Pulmonar: En el parénquima pulmonar de los cortes histológicos del grupo control no se

observó signos de alteraciones. Los bronquios intrapulmonares y los bronquiolos mostraron su estructura conservada, sacos alveolares y alvéolos de forma definidas y estructura conservadas, sin lesiones aparentes (Figura 6). A las 12 horas post-inyección el veneno de (CDC) y de (CV) induce alteraciones histopatológicas revelando hiperemia, enfisema, hemorragia difusa severa y edema (Figura 7,8). Los cortes histológicos a las 24 horas post-inyección reveló hemorragia difusa severa, enfisema e hiperemia. (Figura 9,10).

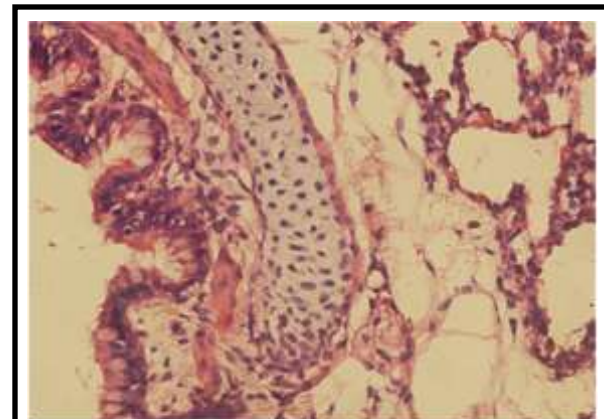


Figura 6: Corte histológico de Pulmón de ratón NMRI inoculado con solución fisiológica 0,9 % (grupo control). Alveolo pulmonar (1); Bronquio intrapulmonar (2); tabique interalveolar (3) H-E (40X)

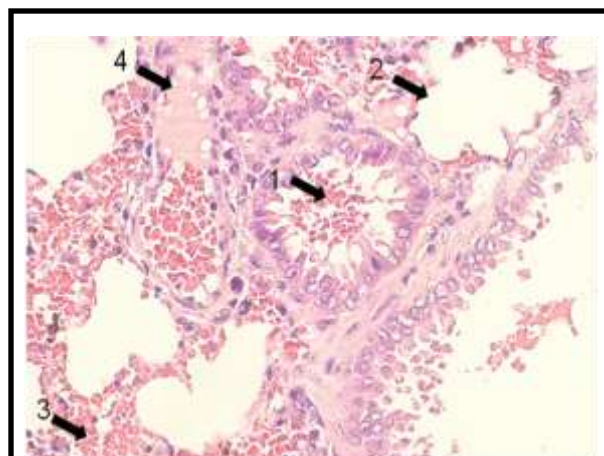


Figura 7: Corte histológico de Pulmón de ratón NMRI a las 12 horas post inyección con veneno *Crotalus d. cumanensis*. Hiperemia (1); enfisema (2); hemorragia difusa severa (3) edema (4). H-E (40X)

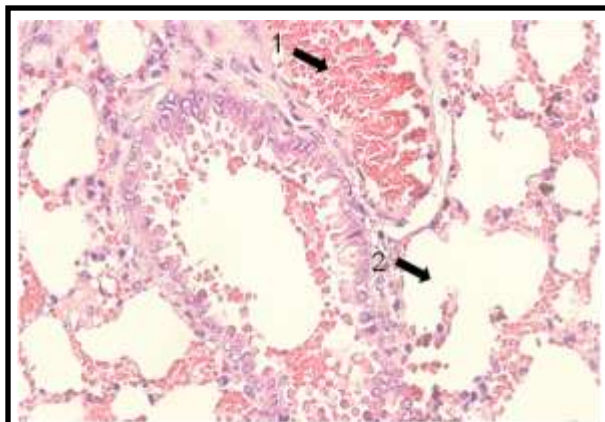


Figura 8: Corte histológico de Pulmón de ratón NMRI a las 12 horas post inyección con veneno *Crotalus d. vegrandis*. Hiperemia (1); enfisema (2). H-E (40X)

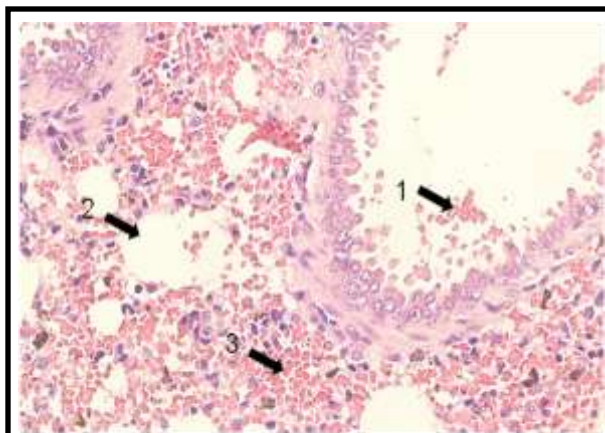


Figura 9: Corte histológico de Pulmón de ratón NMRI a las 24 horas post inyección con veneno *Crotalus d. cumanensis*. Hiperemia (1); enfisema (2); hemorragia difusa severa (3). H-E (40X)

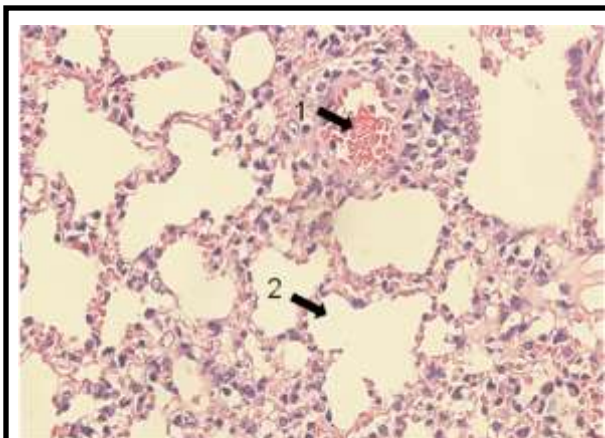


Figura 10: Corte histológico de Pulmón de ratón NMRI a las 24 horas post inyección con veneno *Crotalus d. vegrandis*. Hiperemia (1); enfisema (2). H-E (40X)

En contraposición con lo presentado en esta investigación, Franca y colaboradores [12], no encontraron evidencia de daño pulmonar al emplear veneno de *Crotalus durissus terrificus*, a diferencia de nuestro estudio que muestra daño en la arquitectura del tejido por efecto del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus vegrandis*, sin embargo es importante señalar que hay variabilidad del efecto de los venenos de serpientes, entre la misma especie. El veneno de veneno (CDC) y (CV) tienen efectos nivel pulmonar.

Sin embargo; [13] encontraron en cortes de pulmón luego de una hora de inocular 9 µg de Gyroxina una toxina de *Crotalus terrificus* congestión del septum alveolar y trombosis intravascular que se agravó luego de dos horas de inoculación.

Tejido Músculo esquelético: El estudio histopatológico en los ratones inoculados con solución fisiológica reveló fibras musculares estriadas esqueléticas de aspecto normal, citoplasma acidófilo homogéneo y núcleos posicionados excéntricamente y de aspecto conservado (Figura 11). Los animales correspondientes a los grupos experimentales de 12 horas post-inoculados con veneno de (CDC) y de (CV) se evidenciaron las siguientes alteraciones histopatológicas: pequeños grupos de células musculares con edema, degeneración y necrosis de Zenker e infiltrado de células inflamatorias y leve necrosis de tejido adiposo cercano a músculo (Figura 12,13).

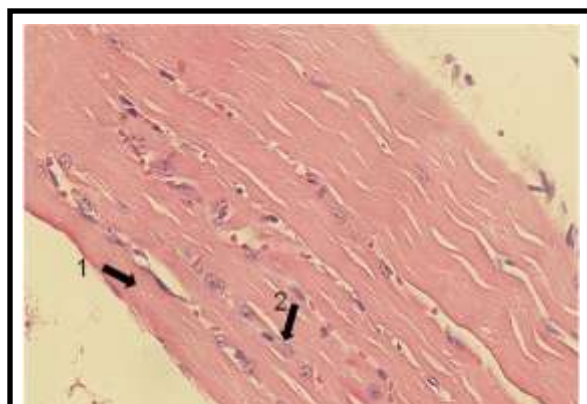


Figura 11: Corte histológico de Músculo estriado esquelético de ratón NMRI inoculado con solución fisiológica 0,9 % (grupo control). Fibra muscular estriada esquelética conservada (1); núcleos conservados (2). H-E (40 X)

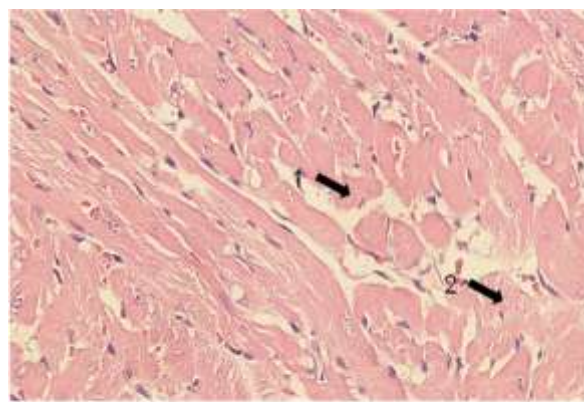


Figura 12: Corte histológico de Músculo estriado esquelético de ratón NMRI a las 12 horas post inyección con veneno *Crotalus d. cumananis*; Células musculares con edema (1); degeneración y necrosis de zenker (2) H-E (40 X)

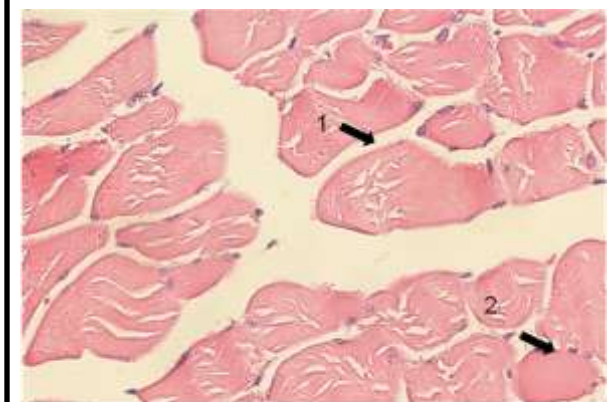


Figura 14: Corte histológico de Músculo estriado esquelético de ratón NMRI a las 24 horas post inyección con veneno *Crotalus d. cumananis*; Células musculares con edema (1); leve pérdida de las estriaciones en fibras musculares y aspecto hialino (2) H-E (40 X)

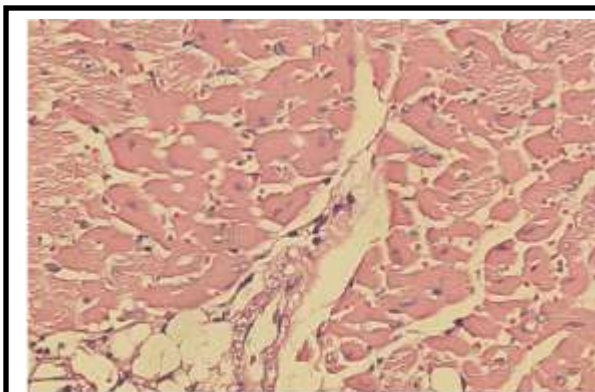


Figura 13: Corte histológico de Músculo estriado esquelético de ratón NMRI a las 12 horas post inyección con veneno *Crotalus d. vegrandis*; Células musculares con edema (1); degeneración y necrosis de zenker (2); infiltrado de células inflamatorias (3); y necrosis en tejido adiposo adyacente (4) H-E (40X.)

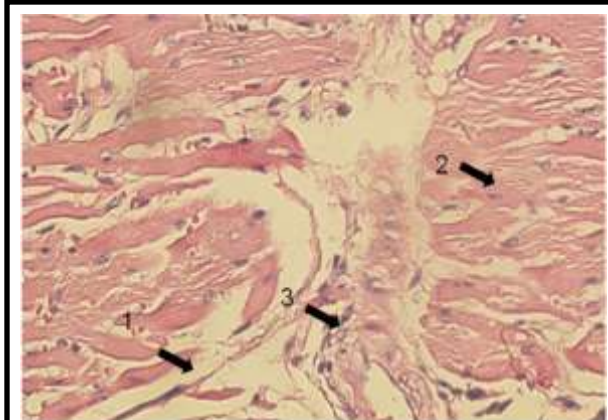


Figura 15: Corte histológico de Músculo estriado esquelético de ratón NMRI a las 24 horas post inyección con veneno *Crotalus d. vegrandis*; Células musculares con edema (1); degeneración y necrosis de zenker (2); infiltrado de células inflamatorias (3). H-E (40X.)

A las 24 horas los ratones inoculados con veneno de (CDC) en el estudio histopatológico se observó: fibras musculo esqueléticas separadas por la presencia de edema, leve pérdida de las estriaciones de las fibras musculares y con aspecto hialino (Figura 14). Mientras que, con el veneno de (CV) se observaron en los cortes histopatológicos células musculares con edema, degeneración y necrosis de Zenker e infiltrado de células inflamatorias (Figura 15).

Las alteraciones histopatológicas en el tejido musculo esquelético observadas en el presente estudio, difieren de las reportadas por Sangiorgio y colaboradores [14], donde observaron una grave miositis necrótica focal escasa o difusa [14] y hialinización difusa acompañada de áreas necróticas [11]. Estudios empleando el veneno de *Bothrops alternatus* reportan lesiones de hemorragias, necrosis de las fibras musculares e infiltrado inflamatorio [15] resultados similares a los obtenidos en el presente estudio.

CONCLUSIONES

En conclusión este estudio demostró que los venenos *Crótalus durissus cumanensis* y *Crótalus vegrandis* induce alteraciones histopatológicas en los tejidos hepático, pulmonar y muscular esquelético, que podría atribuirse a la actividad fosfolipásica del veneno. Se recomienda continuar realizando estudios para determinar los efectos histológicos causados por el accidente ofídico en diferentes tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SASA M. Snakebite envenomation in costa rica: revisión of incidence in the decade 1990 – 2000. *Toxicon*.
2. PIRELA R et al: Caracterización toxinológica del veneno total de la serpiente de cascabel *Crotalus durissus cumanensis* (viperidae), presente en la localidad de Porshoure guajira venezolana. *Rev. Cient. FCV-LUZ XVI* (3): 232 – 233. 2006.
3. LANCINI V. Serpientes de Venezuela. 2da Ed. Ernesto Armitaño (Ed). Venezuela. Pp. 262. 1986
4. GARCIA PEREZ J: Una nueva especie de cascabel (Serpientes: Crotalidae) para el bolsón árido de Lagunillas, Cordillera de Mérida, Venezuela. *Revista Ecológica Lat. Am.* Vol. 3 N° (1-3), Art. 2 pp, 07 – 12, 1995.
5. FUENMAYOR Y et al: Dosis letal 50 del veneno de *Crotalus durissus cumanensis* y *Crotalus durissus vegrandis* (serpientes, viperidae) en los modelos murinos NMRI y BALBC. Trabajo de Grado. Escuela de Ciencias de la Salud. Universidad de Oriente. Venezuela 18 – 19 p. 2009.
6. BOADAS J et al: Boletín de malariología y salud ambiental. Reporte epidemiológico: Perfil eco-epidemiológico de los accidentes por ofidios en Monagas Venezuela (2002 – 2006). Vol. LII (1): 108. 2012
7. PEREZ M et al: Niveles séricos de ALT, AST y su índice en ratones (MNRI) inoculados con veneno de *Crotalus durissus cumanensis* de perfiles electroforéticos distintos. *Gaceta de ciencias veterinarias*. 15 (1): 12. 2010.
8. SOTELO-CRUZ N: Envenenamiento por mordedura de serpiente de cascabel, daños a la salud y su tratamiento en edad pediátrica. *Gaceta médica México*. Vol.139 (4): 2. 2003.
9. LUNA BAUZA: Mordeduras por serpiente. *Panorama epidemiológico de Córdoba, Veracruz*. *Rev. Fac. Med UNAM*. 47 (4): 150. 2004.
10. DE ROODT A et al: Toxicidad de venenos de serpientes de importancia médica en México. *Gaceta médica México*. 141(1): 14. 2005.
11. SADNER M: Of Ponz De Venez. “Bothrops venezuelae, sp. Nov.” *Novedades científicas*”. N: 30. 1961
12. NORIEGA A J et al: Cambios séricos en las enzimas ALT, AST, FA – CK- TOTAL y LDH Inducidos por Veneno de *Crotalus durissus Cumanensis* en Ratones Balb/C. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinaria LUZ*. Vol. XIX, N° 4: 408 – 413. 2009.
13. FRANÇA R et al: Hepatotoxicidad aguda de *Crotalus durissus terrificus* (serpiente de cascabel de América del sur) veneno en ratas. *J. Venom. Anim. Las toxinas incl. Trop. Dis Botucatu*, vol.15 N° 1. 2009.
14. MARUÑAK S et al: mice plasma fibrinogen consumption by thrombin-like enzyme present in rattlesnake venom from the north-east region of Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 64: 509 – 517. 2004.
15. SANGIORGIO F et al: Histopatológico evaluación de envenenamiento experimental de perros con *Crotalus durissus terrificus* veneno. *J. Venom. Anim. Las toxinas incl. Trop. Dis Botucatu*. vol.14 no.1. 2008.
16. TEIBLER P et al: Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops Alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina. *Acta toxicológica argentina*. Vol. 7 (1) 8 – 9. 1999.